

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-000470

(43)Date of publication of application : 05.01.1990

(51)Int.Cl.

C12P 13/02  
 C12P 17/00  
 C12P 17/04  
 C12P 17/10  
 C12P 17/12  
 // C12N 9/78  
 (C12P 13/02  
 C12R 1:01 )  
 (C12P 17/00  
 C12R 1:01 )  
 (C12P 17/04  
 C12R 1:01 )  
 (C12P 17/10  
 C12R 1:01 )  
 (C12P 17/12  
 C12R 1:01 )

(21)Application number : 63-231744

(71)Applicant : YAMADA HIDEAKI

(22)Date of filing : 16.09.1988

(72)Inventor : YAMADA HIDEAKI  
 NAGASAWA TORU

(30)Priority

Priority number : 62234597    Priority date : 18.09.1987    Priority country : JP  
 63 72766    26.03.1988

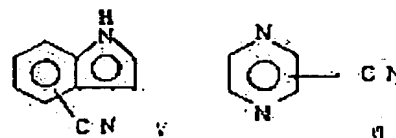
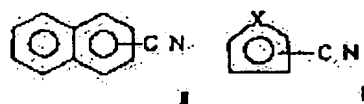
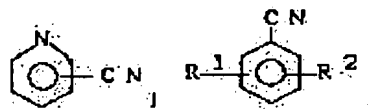
JP

## (54) BIOLOGICAL PRODUCTION OF AMIDE

(57)Abstract:

PURPOSE: To advantageously obtain nicotinamide or pyrazinamide by subjecting aromatic nitrile to hydration by the action of specific nitrile hydratase enzyme and converting to corresponding amide.

CONSTITUTION: A microorganism of *Rhodococcus rhodochrous* [e.g., J-1 strain (FERM BP-1478)] is inoculated to medium containing 2.6 g/l enzyme derivative (e.g., acetonitrile) and 5-15mg/l (calculated as CoCl<sub>2</sub>) Co source and subjected to shake culture at pH7-9 and 15-50° C for ≥30 hour to obtain nitrile hydratase. Next, 4-10C aromatic nitrile expressed by formula I-IV (R<sub>1</sub>-2 is H, CH<sub>3</sub>, OH, OCH<sub>3</sub>, Cl, F, CN, NH<sub>2</sub> or NO<sub>2</sub>; X is S or O) is added to a culture solution containing said enzyme and a hydration reaction is carried out to convert to corresponding amide.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

## ⑫ 公開特許公報(A) 平2-470

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)1月5日

C 12 P 13/02  
17/00  
17/04  
17/10  
17/127236-4B  
8931-4B  
8931-4B  
8931-4B  
8931-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 9 (全12頁)

⑭ 発明の名称 アミドの生物学的製造法

⑯ 特 願 昭63-231744

⑰ 出 願 昭63(1988)9月16日

優先権主張 ⑱ 昭62(1987)9月18日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭62-234597

㉑ 昭63(1988)3月26日 ㉒ 日本(JP) ㉓ 特願 昭63-72766

㉔ 発 明 者 山 田 秀 明 京都府京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19番地の1

㉕ 発 明 者 長 沢 透 京都府京都市左京区高野東開町1-7

㉖ 出 願 人 山 田 秀 明 京都府京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19番地の1

㉗ 代 理 人 弁理士 佐藤 一雄 外2名

最終頁に続く

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

アミドの生物学的製造法

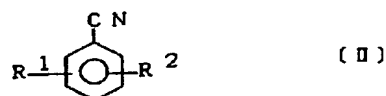
## 2. 特許請求の範囲

1. 微生物由来のニトリルヒドラーゼ酵素の作用によってニトリルを水和してこれを対応するアミドに変換する方法において、該ニトリルヒドラーゼが、ロドコッカス属ロドクロウス種(Rhodococcus rhodochrous)の微生物をコバルトイオン存在下に培養して得たものであることを特徴とする、アミドの生物学的製造法。

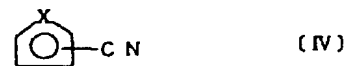
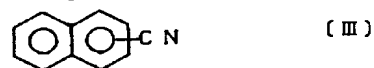
2. 微生物が、ロドコッカス属ロドクロウス種のJ-1株(FERM BP-1478号)である、請求項1記載のアミドの生物学的製造法。

3. ニトリルが、芳香環を形成する炭素数が4~10の芳香族ニトリルである、請求項1~2のいずれか1項記載のアミドの生物学的製造法。

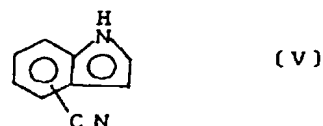
4. 芳香族ニトリルが、下記的一般式(I)~(VI)で示される化合物のいずれかである、請求項3記載のアミドの生物学的製造法。

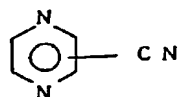


(ここで、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それぞれH、CH<sub>3</sub>、OH、OCH<sub>3</sub>、Cl、F、CN、NH<sub>2</sub>またはNO<sub>2</sub>である)



(ここで、XはSまたはOである)





(VI)

5. 芳香族ニトリルが2-シアノピリジン、3-シアノピリジンまたは4-シアノピリジンである、請求項4記載のアミドの生物学的製造法。
6. 芳香族ニトリルが3-シアノピリジンである、請求項5記載のアミドの生物学的製造法。
7. 芳香族ニトリルがシアノピラジンである、請求項4記載のアミドの生物学的製造法。
8. ニトリルが、炭素数2～6の脂肪族ニトリルである、請求項1～2のいずれか1項記載のアミドの生物学的製造法。
9. 炭素数2～6の脂肪族ニトリルが、アクリロニトリルである、請求項8記載のアミドの生物学的製造法。

れていて、アクリルアミドの有利な製造法として注目されている。

このようなアミドの生物学的製造法に使用されるものとして既にいくつかの微生物が提案されているのであるが、本発明者らの知るところでは、これらの微生物は低級脂肪族ニトリルの水合には有効であっても、芳香族ニトリルの水合には必ずしも有効ではない。たとえば、3-シアノピリジンを水合してニコチン酸アミドを製造する方法は、収率が低くて工業的には実施し難い。

ところで、微生物の培養を鉄イオンあるいはマンガニイオンの存在下に行なうことが一般に知られており、アミドの生物学的製造にもこの技術は利用されていて、たとえばロドコッカス属の微生物の培養を鉄イオンの存在下に行なう例を特開昭61-162193号および特開昭62-91189号各公報にみることができる。

本発明者らの検討したところによれば、シュードモナス属細菌由来のニトリル水合酵素(ニトリルヒドラターゼ)はその活性中心に $Fe^{+++}$ を含

### 3. 発明の詳細な説明

#### [発明の背景]

#### (技術分野)

本発明は、微生物由来のニトリルヒドラターゼの作用によってニトリルを水合してこれに対応するアミドに変換させる方法に関する。さらに具体的には、本発明は、使用する微生物およびニトリルヒドラターゼの産生方法に主要な特徴を有するアミドの生物学的製造法に関する。

#### (先行技術)

低級脂肪族アミド、たとえばアクリルアミド、は対応するニトリル、たとえばアクリロニトリルの水合によって製造されるが、この水合を微生物の産生する酵素(ニトリラーゼあるいはニトリルヒドラターゼ)の作用によって行なう方法が提案されている(たとえば、特公昭62-21519号、特開昭61-162193号、特開昭62-91189号、特公昭56-17918号および特公昭59-37951号公報参照)。このようなアミドの生物学的製造法は、工業的にも実施さ

んでおり、従ってこの微生物の培養には培地中に鉄イオンが存在することが必須であったが、ロドコッカス属の微生物についての前記の公知例の場合にもその培養の際の培地中の鉄イオンはニトリル水合酵素産生のために必須のものであると推定される。

#### [発明の概要]

#### (要 旨)

本発明は、上記の知見に反して、ロドコッカス属の特定の菌株、すなわちロドクロウス種のJ-1株、が鉄イオン含有培地ではニトリルヒドラターゼを産生しないことならびにコバルトイオン含有培地においてはじめてニトリルヒドラターゼを産生すること、ならびにこのようにして産生されたニトリルヒドラターゼは芳香族ニトリルをも基質としてそれをアミドに変換すること、の発見に基いてなされたものである。

従って、本発明によるアミドの製造法は、微生物由来のニトリルヒドラターゼ酵素の作用によってニトリルを水合してこれに対応するアミドに変

換する方法において、該ニトリルヒドラターゼが、ロドコッカス属ロドクロウス種 (*Rhodococcus rhodochrous*) の微生物をコバルトイオン存在下に培養して得たものであること、を特徴とするものである。

#### (効 果)

本発明によれば、鉄イオン含有培地ではニトリルヒドラターゼ活性がゼロであるのに対して、コバルトイオン含有培地ではじめてニトリルヒドラターゼ活性が発現する。ニトリルヒドラターゼ発現についてこの特定の微生物の金属イオン要求性の臨界性は、全く思いがけなかったことと解される。

また、本発明によれば、芳香族ニトリルの水和を有利に行なうことができる。ピクミン原料等としてのニコチン酸アミド(すなわち3・シアノピラジンの水和物)あるいは抗結核薬として有用なピラジニアミド(すなわちシアノピラジンの水和物)の重要性からいって、本発明のこの効果は有用なものである。

を回収して、これを酵素製品として使用する方法があるが、このようなふつうの触媒反応のような場合をも本発明では「生物学的製造法」として扱うものとする。

## 2. 水和反応の詳細

### 1) 微生物

本発明で使用する微生物は、ロドコッカス属ロドクロウス種 (*Rhodococcus rhodochrous*) のものである。

この種の株の代表的なものは、J-1株である。

J-1株の詳細は下記の通りである。

#### (1) 由来および寄託

J-1株は、本発明者らが京都市左京区の土壌から採取したものであって、昭和62年9月18日に工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されて、FERM BP-1478号の受託番号を得ている。

#### (発明の具体的説明)

### 1. アミドの生物学的製造の基本的内容

本発明は微生物由来のニトリルヒドラターゼの作用によってニトリルを水和してこれをアミドに変換する方法であるが、この方法は基本的には微生物の培養およびニトリルヒドラターゼの誘導ならびに得られたニトリルヒドラターゼの基質ニトリルに対する作用からなる。

これらは単位操作としてそれ自身公知であって、本発明でも合目的な任意の態様を採ることができる。本発明で「微生物をコバルトイオン存在下に培養して得たものである」ということは、ニトリルヒドラターゼの誘導が行なわれたことを当然の前提とするものである。

本発明が前提とする「微生物由来のニトリルヒドラターゼ酵素の作用によってニトリルを水和してこれを対応するアミドに変換する方法」は、ニトリルヒドラターゼの作用のさせ方について合目的な任意の態様を包含するものである。そのような態様の一つとして、微生物に産生させた酵素

## (2) 菌学的性質

### (a) 形 態

- |                    |  |
|--------------------|--|
| (1) 細胞の形および<br>大きさ | 0.9~1.0 $\mu$ × 3~10 $\mu$                         |
| (2) 細胞の多形性の有無      | 培養初期に長桿状を呈し、棍棒状で湾曲なくスナッピングを伴った発育を示し、のちに短桿菌し、後に断裂する |
| (3) 運動性            | なし   |
| (4) 胞子の有無          | なし   |
| (5) グラム染色性         | 陽性   |
| (6) 抗酸性            | 陰性   |
| (7) 芽染小体           | 認められる  |

### (b) 各培地における生育状態(30℃)

- |              |  |
|--------------|--|
| (1) 肉汁寒天平板培養 | 直径1cm(48時間)円形、不規則、平滑で表面乾き気味、扁平、不透明、淡オレンジピンク色 |
| (2) 肉汁寒天斜面培養 | 糸状、表面平滑、断面はやや隆起状で乾き気味、淡オレンジピンク色              |
| (3) 肉汁液体培養   | 菌膜を形成し、旺盛に発育する。生                             |

|   |                                 |                             |  |
|---|---------------------------------|-----------------------------|--|
| 育するにしたがって、中程度の濁り、沈澱を生ずる。                                  |                                 | (11)ウレアーゼ                   | 陽 性  |
| (4) 肉汁ゼラチン穿刺培養  |                                 | (12)オキシダーゼ                  | 陰 性  |
| 表面に良く生育、穿刺部にそってロート状に発育するが、下層部にはほとんど発育しない。ゼラチンは、液化は認められない。 |                                 | (13)カタラーゼ                   | 陽 性  |
| (5) リトマスミルク   |                                 | (14)セルロースの加水分解              | 陰 性  |
| (c) 生理学的性質  |                                 | (15)生育の範囲                   | pH: 5~10<br>温度: 10~41℃                               |
| (1) 硝酸塩の還元  | 陽 性                             | (16)酸素に対する態度                | 好気性  |
| (2) 脱窒反応  | 陰 性                             | (17)チロシンの分解                 | 陽 性  |
| (3) MRテスト   | 陰 性                             | (18)アデニンの分解                 | 陽 性  |
| (4) VPテスト   | 陰 性                             | (19)ホスファターゼ                 | 陽 性  |
| (5) インドールの生成  | 陽 性                             | (20)Tween 80                | 陽 性  |
| (6) 硫化水素の生成   | 陽 性                             | 加水分解                        |  |
| (7) デンプンの加水分解   | 陰 性                             | (21)O-Fテスト                  | O (弱い)   |
| (8) クエン酸の利用   | コーサーの培地: 陰 性<br>クリステンセンの培地: 陽 性 | (22)耐熱性 (10%スキムミルク中72℃、15分) | なし   |
| (9) 無機窒素源の利用  | 硝酸塩: 陽 性<br>アンモニウム塩: 陽 性        | (23)糖から酸およびガスの生成            | 酸の生成    ガスの生成  |
| (10)色素の生成   | 陰 性                             | ガス生成                        |  |
|   |                                 | ラーアラビノース                    | -  |
| D-キシロース   | -                               | アジピン酸ナトリウム                  | +  |
| D-グルコース   | +                               | 安息香酸ナトリウム                   | +  |
| D-マンノース   | -                               | クエン酸ナトリウム                   | +  |
| D-フラクトース  | +                               | 乳酸ナトリウム                     | +  |
| 麦芽糖   | +                               | テストテトロン                     | +  |
| ショ糖   | +                               | L-チロシン                      | +  |
| 乳糖  | -                               | グリセール(1%)(W/V)              | (+)  |
| トレハロース  | -                               | トレハロース                      | (+)  |
| D-ソルビット   | +                               | p-ハイドロキシ安息香酸(1%)(W/V)       | +  |
| D-マンニット   | +                               |                             |  |
| グリセリン   | +                               |                             |  |
| (24)単一炭素源としての生育   |                                 | (+)                         | 弱い陽性である。   |
| イノシトール  | -                               | (25)脂肪酸と細胞壁分析               | 不飽和、飽和直鎖脂肪酸、およびツベルクロスステアリン酸を含む。ミコール酸のTLCは単一スポットを与える。 |
| 麦芽糖   | +                               |                             |  |
| D-マンニット   | +                               |                             |  |
| ラムノース   | -                               |                             |  |
| D-ソルビット   | +                               |                             |  |
| m-ハイドロキシ安息香酸  | +                               |                             |  |

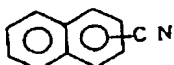
以上の菌体的性質をバージーの細菌分類書 (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) (1986) に基づいて分類すると、J-1株は、好気性、グラム陽性、弱抗酸性、カタラーゼ陽性の内生胞子を生じない桿菌であり、鞭毛を有しない。また、発育の初期過程で長桿菌状で菌糸状を呈し、枝分れ (Branching) を伴った発育を示し、後に短桿菌状に断裂することよりノカルディア型の細菌に属するものと認められる。

脂肪酸組成の分析は、ツベルグロステアリン酸を含む不飽和、飽和の直鎖脂肪酸を含む。ミコール酸の TLC は標準菌 *Rhodococcus rhodochrous* (IFO 3338) と同じ R<sub>f</sub> を示す単一スポットを与えることから、*Mycobacterium* 属とは区別される。またミコール酸の組成 (炭素数) から *Nocardia* 属とは区別される。その他生化学的諸性質の検討から、本菌は *Rhodococcus rhodochrous* と認められる。

2) 基質/ニトリル

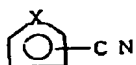
上記のような微生物の産生するニトリルヒドラーゼの基質となるニトリルは、芳香族および脂

p-フルオロベンズニトリル、o-およびm-ニトロベンズニトリル、p-アミノベンズニトリル、o-、m-およびp-トルニトリル、4-シアノフェノール、アニソニトリル、フタロニトリル、イソフクロニトリル、テレフクロニトリル、2, 6-ジクロロベンズニトリル、2, 4-ジクロロベンズニトリル、2, 6-ジフルオロベンズニトリル、がそれぞれである。



(III)

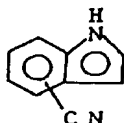
例えば、α-およびβ-ナフトニトリル、がそれである。



(IV)

(ここで、XはSまたはOである)

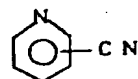
例えば、2-チオフェンカルボニトリルおよび2-フロニトリル、がそれぞれである。



(V)

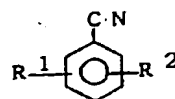
肪族のモノニトリルまたはジニトリル、就中モノニトリル、である。

本発明の特色を最もよく享受するのは、芳香族ニトリル、特に芳香環を形成する炭素数が4~10のもの、である。芳香族ニトリルの具体例のいくつかを例示すれば下記の通りであって、下記の一般式 (I) ~ (VI) で示される化合物が挙げられる。



(I)

例えば、4-、3-、および2-シアノピリジン、がそれぞれである。

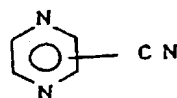


(II)

(ここで、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、それぞれ、H、CH<sub>3</sub>、OH、OCH<sub>3</sub>、Cl、F、CN、NH<sub>2</sub> または NO<sub>2</sub> である。)

例えば、ベンズニトリル、o-、m- および p-クロロベンズニトリル、o-、m- および

例えば、5-シアノインドール、がそれぞれである。



(VI)

すなわち、シアノピラジンである。

本発明で対象とするニトリルの他の一群は、脂肪族ニトリルである。炭素数2~6のモノまたはジニトリル、就中モノニトリル、が適当である。生成アミドの有用性からいって、アクリロニトリルが代表的であり、また生産性も良好である。

これらのニトリルに対応するアミドは、CN基がCONH<sub>2</sub>基に変換されたものであることはいうまでもない。なお、ジニトリルの場合はCN基の少なくとも1個がCONH<sub>2</sub>に変換したものを対応するアミドと考えるものとする。

### 3) 培養/ニトリルヒドラーゼの産生

ロドコッカス属ロドクロウス種の微生物の培養は、培地にコバルトイオンが存在するというものを除けば、他の条件に関してはそれが合目的なものである限り制限はない。培地中に酵素誘導剤

(詳細後記)を存在させておいてニトリルヒドラーゼを菌体中に蓄積させることがふつうであることは前記したところである。

### (1) 基本培地

適当な培地のいくつかを例示すれば、下記の通りである。挙示の成分の量を変え、ある成分を他の成分と置きかえ、ある成分を省略し、あるいは他の成分を追加することは、当業者にとって容易であろう。

#### (イ) 培地 A

| 成 分                   | 量 (培地 1 l 中) |
|-----------------------|--------------|
| ビタミン混合物 <sup>※1</sup> | 0.1 ml       |
| $K_2HPO_4$            | 13.4 g       |
| $KH_2PO_4$            | 6.5 g        |
| NaCl                  | 1.0 g        |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  | 0.2 g        |
| 蒸留水                   | 残部 (pH 7.0)  |

※1 組成 (溶液 1 l 中)

|             |           |
|-------------|-----------|
| ビオチン        | 2 $\mu$ g |
| パントテン酸カルシウム | 0.4 mg    |

|           |         |
|-----------|---------|
| イノシトール    | 2 mg    |
| ニコチン酸     | 0.4 mg  |
| 塩酸チアミン    | 0.4 mg  |
| 塩酸ピリドキシン  | 0.4 mg  |
| p-アミノ安息香酸 | 0.2 mg  |
| リボフラビン    | 0.2 mg  |
| 葉酸        | 0.01 mg |
| 蒸留水       | 残部      |

#### (ロ) 培地 B

|         |             |
|---------|-------------|
| グリセロール  | 10 g        |
| ペプトン    | 5 g         |
| モルトエキス  | 3 g         |
| イーストエキス | 3 g         |
| 蒸留水     | 残部 (pH 7.2) |

#### (ハ) 培地 C

|                      |             |
|----------------------|-------------|
| イーストエキス              | 3 g         |
| $KH_2PO_4$           | 0.5 g       |
| $K_2HPO_4$           | 0.5 g       |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.5 g       |
| 蒸留水                  | 残部 (pH 7.2) |

### (2) 酵素誘導剤

ロドコッカス属ロドクロウス種の微生物にニトリルヒドラーゼを誘導産生させる酵素誘導剤は、合目的的な任意のものがありうる。

本発明で適当な誘導剤は、ニトリルおよびアミドが代表的である。

J-1株についてその効果を確認している酵素誘導剤の具体例を挙げれば、下記のものがある。

クロトンアミド、アセトニトリル、プロピオンニトリル、ベンズアミド、プロピオンアミド、アセトアミド、イソバレロニトリル、n-ブチロニトリル、イソブチロニトリル、n-カプロニトリル、3-ペンテンニトリル、ピバロニトリル、n-ブチルアミド、イソブチルアミド、n-バレルアミド、n-カブロンアミド、メタクリルアミド、フェニルアセトアミド。

### (3) コバルト源

上記のような酵素誘導剤を培地に存在させてもニトリルヒドラーゼは得られないので、本発明では培地にコバルトイオンを存在させることが必

須である。

培地が水性であるところより、コバルトイオンは水溶性コバルト化合物を培地に添加することによって生成させることがふつうである。水溶性のコバルト化合物は化学辞典類の明らかにするところであり、適当なものを選択使用することは(場合によっては簡単な予備試験を行なって)当業者は容易であろう。代表的なコバルト化合物は、たとえば $Co^{++}$ または $Co^{+++}$ を与えるもの、特に $Co^{++}$ を与えるもの、であって、具体的には塩化コバルト、硫酸コバルト、酢酸コバルト、臭化コバルト、硝酸コバルト、その他を例示することがてできる。

この他、本発明ではビタミン $B_{12}$ および金属コバルトも使用できる。ビタミン $B_{12}$ 中にはコバルトが骨格として含まれており、培養の際イオン化する。また、金属コバルトは培養中微生物による酸化力でイオン化する。

### (4) 培養

ニトリルヒドラーゼを菌体内に産生蓄積させ

るための培養は、使用微生物たとえばJ-1株を前記のような培地で適当な条件で実施すればよい。

酵素誘導剤の使用量は培地1リットル中2~6g程度であり、コバルトイオンの使用量は培地1リットル当り $\text{CoCl}_2$ 換算で5~15mg程度である。

具体的な培養培地組成を示せば、下記の通りである。

|                 |       |
|-----------------|-------|
| (イ) 培地A         | 1リットル |
| アセトニトリル(誘導剤)    | 2g    |
| $\text{CoCl}_2$ | 10mg  |
| (ロ) 培地B         | 1リットル |
| イソバレロニトリル(誘導剤)  | 2g    |
| $\text{CoCl}_2$ | 10mg  |
| (ハ) 培地C         | 1リットル |
| クロトンアミド(誘導剤)    | 2g    |
| $\text{CoCl}_2$ | 10mg  |

このような培養培地で15~50℃程度、好ましくは20~45℃程度、特に好ましくは30℃前後、pH7~9で約30時間以上、好ましくは

40時間以上(上限は、たとえば120時間)、J-1株を振盪培養すれば、ニトリルヒドラーゼを有利に産生させることができる。酵素誘導剤は培養当初から存在させることが好ましく、特に高活性の菌体を調製するためには、たとえば28℃76時間振盪培養するときに、26時間日および56時間日にそれぞれ0.2%(w/v)の濃度となるようにクロトンアミドを培地に追加添加する方法を採ることが望ましい。

#### 4) ニトリルの水和

本発明が前提とする「微生物由来のニトリルヒドラーゼ酵素の作用によってニトリルを水和してこれに対応するアミドに変換する方法」とは、ニトリルヒドラーゼの作用のさせ方について今日的な種々の態様を包含するものであることは前記したところである。

そのような態様の一つは、微生物の培養系に基質のニトリルを存在させておいて、培地中にアミドを生成させることである。

ニトリルヒドラーゼを作用させる態様の他の

一つは、ニトリルヒドラーゼが蓄積されている培養液に基質ニトリルを添加して水和反応を行なわせることである。この態様の改変例として、菌体を破砕した培養液を使用する方法が挙げられよう。

ニトリルヒドラーゼを作用させる態様のさらに他の一つは、ニトリルヒドラーゼを蓄積した菌体を培養液から分離して、好ましくはこれを適当な担体に担持させて「固定化」して、基質と接触させる方法である。この方法、特にこの好ましい態様は、上記の第二の態様と並んで、あるいは第二の態様以上に、工業的実施に適したものといえる。担体の種類および微生物の担持方法を含めて、そして所謂バイオリクターとしての固定化微生物の利用も含めて、この技術は周知のものである。

ニトリルヒドラーゼを作用させる態様の他の一つは、ニトリルヒドラーゼ酵素標品を得て、この酵素によっていわば非生物学的にニトリルを水和する方法である。水和反応は、酵素活性が失

なれない範囲のpHおよび温度条件で行なわれることはいうまでもなく、これらの条件は一般に上記の生物学的手法でのそれと同じであるといえる。このような酵素作用時に微生物が存在しない態様も本発明では「生物学的製造法」として取扱うことは前記した通りである。

本発明によるニトリルヒドラーゼは至適pHが7~9、最適pHが8.0である。反応液pHが7未満では、酵素の活性は急激に低下する傾向がある。従って、反応液には緩衝剤を添加することが望ましい。緩衝剤がリン酸カリウムバッファー、トリス/HClバッファー、HEPES/KOHバッファーおよびホウ酸ナトリウムバッファーであっても、ニトリルヒドラーゼの酵素活性に及ぼす生じない。

培養液ないし水和反応液中の基質濃度は、基質の種類によっても異なるが、通常0.5~15モル/リットルであり、また反応温度は通常10~30℃の範囲である。



## 3. 実験例

以下の実験例でニトリルヒドラターゼ活性の測定法および活性の単位は、下記の通りに定義されたものである。

## (1) ニトリルヒドラターゼ活性の測定法

ニトリルヒドラターゼ活性は、ベンズニトリル 10 mM、リン酸カリウムバッファー (pH 7.0) 30 mM、および所定量の菌体 (培養液から分離したもの) を含む反応混合液 2 ml について、10℃で5分間反応を行なわせてから 0.2 ml の 1 N HCl を添加して反応を停止させることによって測定する。

## (2) ユニットの定義

ニトリルヒドラターゼ活性の 1 ユニット (U) は、上記の条件でベンズニトリルからベンズアミドを 1 μmol/分の速度で生成させる酵素の量、として定義されたものである。

## 参考例 1

下記の組成の培地および培養条件で J-1 株を

培養し、その際に  $\text{CoCl}_2$  および (または)  $\text{FeSO}_4$  を添加してニトリルヒドラターゼ活性の発現を調べた。

## (イ) 培地組成

| 成分  | 量 (培地 1 l 中) |
|---|--------------|
| ビタミン混合物                                   | 3 ml         |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$                  | 0.5 g        |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | 0.5 g        |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.5 g        |
| プロピオニトリル                                  | 2 ml         |
| 蒸留水                                       | 残り (pH 7.2)  |

## (ロ) 培養条件

28℃/70~80時間

得られた結果は、下記の通りであった。

基本培地に  $\text{FeSO}_4$  を添加してもニトリルヒドラターゼ活性は発現しないこと、 $\text{CoCl}_2$  の添加によってニトリルヒドラターゼ活性が発現すること、ならびに  $\text{CoCl}_2$  添加系に  $\text{FeSO}_4$  を添加しても結果はむしろ悪化すること、が判る。

## 参考例 2

J-1 株に対する各種のニトリルまたはアミドの酵素誘導剤としての効果は、下表に示すとおりである。

下表の結果は、J-1 株を前記の培地 B で前培養 (28℃) し、同株が十分に増殖してから、ニトリルまたはアミドを前者については 0.1% (v/v)、後者については 0.2% (w/v) の濃度で添加し、さらに 0.001% (w/v)  $\text{CoCl}_2$  を添加した前記培地 C に移し、36~48 時間培養を行なったときのものである。

|                                       |                          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|---------------------------------------|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| $\text{CoCl}_2$<br>( $\mu\text{g}$ )  | 0                        | 0    | 0    | 0    | 0    | 10   | 10   | 10   | 10   | 10   |
| $\text{FeSO}_4$<br>( $\mu\text{g}$ )  | 0                        | 5    | 10   | 20   | 40   | 0    | 5    | 10   | 20   | 40   |
| 菌体量 #1<br>( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | 1.06                     | 1.14 | 1.25 | 1.24 | 1.34 | 2.04 | 1.90 | 2.18 | 2.16 | 2.07 |
| 酵<br>素<br>活<br>性                      | U #2<br>菌体 $\mu\text{g}$ | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0.59 | 0.26 | 0.34 | 0.32 |
|                                       | U<br>培地 ml               | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1.20 | 0.49 | 0.73 | 0.69 |

#1 菌体量: 乾物基準

#2 U: 前記の定義による活性単位。菌体量は乾物基準。

|            | 比 活 性<br>(U/μg) | 全 活 性<br>(U/ml) | 菌 体 量<br>(mg乾燥<br>菌体/ml) |
|------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| クロトンアミド    | 2. 22           | 4. 48           | 2. 02                    |
| アセトニトリル    | 1. 41           | 3. 47           | 2. 46                    |
| プロピオンニトリル  | 1. 36           | 4. 44           | 3. 26                    |
| ベンズアミド     | 0. 84           | 2. 75           | 3. 26                    |
| プロピオンアミド   | 0. 79           | 2. 29           | 2. 90                    |
| アセトアミド     | 0. 71           | 1. 55           | 2. 18                    |
| n-ブチロニトリル  | 1. 40           | 0. 38           | 3. 70                    |
| イソブチロニトリル  | 0. 41           | 1. 24           | 3. 06                    |
| イソバレロニトリル  | 0. 34           | 1. 05           | 3. 07                    |
| n-カプロニトリル  | 0. 28           | 1. 04           | 3. 71                    |
| 3-ペンテンニトリル | 0. 32           | 1. 42           | 4. 49                    |
| ビバロニトリル    | 0. 35           | 0. 24           | 0. 69                    |
| n-ブチルアミド   | 0. 43           | 1. 55           | 3. 62                    |
| イソブチルアミド   | 0. 09           | 0. 33           | 3. 48                    |
| n-バレルアミド   | 0. 44           | 1. 08           | 1. 81                    |
| n-カプロンアミド  | 0. 30           | 1. 06           | 3. 52                    |
| メタクリルアミド   | 0. 20           | 0. 62           | 3. 12                    |
| フェニルアセトアミド | 0. 29           | 0. 28           | 0. 95                    |

|                  |       |
|------------------|-------|
| 2-シアノピリジン        | 6. 4  |
| 5-シアノインドール       | 9     |
| 2-チオフェンカルボニトリル   | 11. 6 |
| 2-フロニトリル         | 7. 1  |
| ベンゾニトリル          | 8. 0  |
| 4-シアノフェノール       | 2. 4  |
| p-アミノベンゾニトリル     | 1. 6  |
| m-ニトロベンゾニトリル     | 7     |
| o-ニトロベンゾニトリル     | 1. 6  |
| m-クロロベンゾニトリル     | 2. 9  |
| p-トルニトリル         | 5     |
| o-トルニトリル         | 4. 6  |
| m-トルニトリル         | 3. 2  |
| アニソニトリル          | 2. 0  |
| o-クロロベンゾニトリル     | 4. 1  |
| p-クロロベンゾニトリル     | 7     |
| 2, 4-ジクロロベンゾニトリル | 2     |
| 2, 6-ジクロロベンゾニトリル | 1     |
| シアノピラジン          | 8. 0  |

## 実施例 1

前記の培地CにC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Cl<sub>2</sub> 0. 01g/リットルおよびクロトンアミド2g/リットルを添加してなる培地で培養して得られるJ-1株の菌体と各種のニトリルを基質として用いて反応させた。反応は、培養液2mlより得られる菌体、10mMのリン酸カリウムバッファー(pH8. 0)および200mMの基質よりなる反応液(2ml)を用い、25℃で76時間行なった。反応は0. 2mlの1NHClを加えて停止させ、各基質に対するニトリルヒドラーゼ活性は反応生成物の生成量または基質の消費をHPLCで測定して3-シアノピリジンを基質として用いたときのニトリルヒドラーゼ活性に対する比率(モル基準)、すなわち比活性(%),として示した。

結果は、下記の通りであった。

| 基 質       | 比 活 性 (%) |
|-----------|-----------|
| 3-シアノピリジン | 100       |
| アクリロニトリル  | 106       |
| 4-シアノピリジン | 129       |

## 実施例 2

前記培地CにC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Cl<sub>2</sub> 0. 01g/リットルおよびクロトンアミド2g/リットルを添加してなる培地400mlを1リットルの坂口フラスコの中に入れ、J-1株を接種し、そして振とう機上で28℃で培養した。培養30時間と60時間後に、クロトンアミドを0. 2%(w/v)

(800μg/400ml)添加して培養を続け、培養開始から80時間の時点で培養を終えた。

菌体を遠心分離機(日立SCR20B)で、12000gにて15分間遠心分離することによって採取し、0. 85%NaClで洗浄し、再び遠心分離し、同液の40ml中に再び懸濁させた。その懸濁液の少量の試料を取り、その中の菌体の乾燥重量を測定するのに用いた。

乾燥菌体2. 33μg相当を含む該懸濁液を10mMリン酸カリウム緩衝液(pH8. 0)と4. 57Mの濃度の3-シアノピリジンを含む反応液(4ml)に加え、さらに反応開始3時間および6時間後に、それぞれ0. 55Mおよび

0.49 Mの3-シアノピラジンを追加して、25℃で一晩反応を行った。培養開始から18時間後の生成ニコチン酸アミドの量は、5.58 Mであった。従って、転換率は99.5%であって、培養液1リットル当り681 gのニコチン酸アミドが蓄積されたことに対応する。この濃度では反応混合物はニコチン酸アミドの析出によって固化した。

なお、生成ニコチン酸アミドの同定は、これを結晶として分離して、元素分析、IR、NMRおよび質量分析によって行なった。ニコチン酸の生成は検出されなかった。

#### 実施例3

実施例2で得た菌体懸濁液（乾燥菌体2.33 ag相当）を10 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 8.0）と種々の濃度のシアノピラジンを含む反応液（4 ml）に加えた。反応は25℃で行い、6時間の反応で4 Mのシアノピラジンが、また9時間の反応で6 Mのシアノピラジンが、100%の転換率でピラジンアミドに転換された。一方、前記

反応液（4 ml）に加え、さらに反応開始1時間および3時間後に、それぞれ3 Mのメタクリロニトリルを追加し、25℃で反応を行なったところ、反応開始12時間後に9 Mのメタクリルアミドが100%の転換率で生成した。

また、上記反応において、反応開始5時間後にさらに1 Mのメタクリロニトリルを追加したところ、反応開始24時間後に10 Mのメタクリルアミドが100%の転換率で生成した。10 M濃度は、反応液1リットル当り851 gのメタクリルアミドが生成、蓄積されたことになる。

この反応液を水で希釈し、遠心分離処理（12000 g 15分間）により菌体を除去し、エバポレーターで濃縮、結晶化させ、次いでこの結晶を水に溶解して再結晶させることによりメタクリルアミドの結晶を得た。

#### 実施例5

実施例2で得た菌体懸濁液（乾燥菌体4.66 ag相当）を10 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 8.0）と1 Mのクロトンニトリルを含む反

の2.33 agの代りに乾燥重量4.66 agに相当する菌体を含む懸濁液を同様の反応液（4 ml）に加えた場合は、6時間の反応で7 Mのシアノピラジンが、9時間の反応で8 Mのシアノピラジンが、100%の転換率でピラジンアミドに転換された。ピラジンカルボン酸の生成は認められなかった。

ピラジンアミドは、それが生成するにつれて溶液から晶出した。この結晶性沈降物を直接回収し、メタノールから再結晶させた。この結晶は元素分析、IR、NMRおよび質量分析によりピラジンアミドと同定された。

なお、シアノピラジン、ピラジンアミドおよびピラジンカルボン酸の分析は高速液体クロマトグラフィーによって行なった。

以下の実施例においても本実施例と同様に分析を行った。

#### 実施例4

実施例2で得た菌体懸濁液（乾燥菌体4.66 ag相当）を10 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 8.0）と3 Mのメタクリロニトリルを含む

反応液（4 ml）に加え、さらに反応開始後1時間毎に1 Mのクロトンニトリルを5回添加し、25℃で反応を行なったところ、反応開始6時間後に6 Mのクロトンアミドが100%の転換率で生成した。さらに、反応開始6時間および10時間後に、それぞれ1 Mのクロトンニトリルを添加したところ、反応開始10時間および22時間後に、それぞれ7 Mおよび8 Mのクロトンアミドが100%の転換率で生成した。8 M濃度は、反応液1リットル当り681 gのクロトンアミドが生成、蓄積されたことになる。

クロトンアミドの結晶化は実施例4と同様に行なった。

#### 実施例6

実施例2で得た菌体懸濁液（乾燥菌体4.66 ag相当）を10 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 8.0）と3 Mのアセトニトリルを含む反応液（4 ml）に加え、さらに反応開始1時間および3時間後にそれぞれ3 M、および反応開始6時間後に5 M、のアセトニトリルを添加して25℃で

反応を行ったところ、反応開始12時間後に14 Mのアセトアミドが100%の転換率で生成した。すなわち、反応液1リットル当たり827gのアセトアミドが生成、蓄積されたことになる。

この反応液を水で希釈し、遠心分離処理して菌体を除き、その上澄液をエバポレーターにより濃縮、乾燥し、これをメタノールに溶解して結晶化させることによりアセトアミドの結晶を得た。

#### 実施例7

実施例2で得た菌体懸濁液（乾燥菌体4.66g相当）を10mMリン酸カリウム緩衝液（pH8.0）と3Mの3-ヒドロキシプロピオニトリルを含む反応液（4ml）に加え、さらに反応開始後1時間毎に3Mの3-ヒドロキシプロピオニトリルを4回添加して25℃で反応を行ったところ、反応開始5時間後に15Mの3-ヒドロキシプロピオアミドが100%の転換率で生成した。ここでさらに3Mの3-ヒドロキシプロピオニトリルを添加したところ、反応開始11時間後に18Mの3-ヒドロキシプロピオアミドが100

遠心分離し、同液の40ml中に再び懸濁させた。その懸濁液の少量の試料を取り、その中の菌体の乾燥重量を測定するのに用いた。

乾燥菌体2.96g相当を含む該懸濁液を10mMリン酸カリウム緩衝液（pH8.0）と種々の濃度の3-シアノピリジンを含む反応液（4ml）に加えた。反応は25℃で行い、9時間の反応で8Mの3-シアノピリジンが、また22時間の反応で9Mの3-シアノピリジンが、100%の転換率でニコチン酸アミドに転換された。一方、前記の2.96gの代りに乾燥重量5.92gに相当する菌体を含む懸濁液を同様の反応液（4ml）に加えた場合は、5時間の反応で9Mの3-シアノピリジンが、9時間の反応で12Mの3-シアノピリジンが、100%の転換率でニコチン酸アミドに転換された。12M濃度は、反応液1リットル当たり1.465gニコチン酸アミドが生成蓄積されたことになる。ニコチン酸の生成は認められなかった。

ニコチン酸アミドは、それが生成するにつれて

%の転換率で生成した。すなわち、反応液1リットル当たり1600gの3-ヒドロキシプロピオアミドが生成、蓄積されたことになる。

この反応液を水で希釈し、菌体を遠心分離で除去したのち、エバポレーターにより濃縮し、-20℃で結晶化させ、次いでこの結晶をイソプロパノールに溶解して再結晶させることにより3-ヒドロキシプロピオアミドの結晶を得た。

#### 実施例8

前記培地Cに $\text{CocI}_2$  0.01g/リットルおよびクロトンアミド2g/リットルを添加してなる培地400mlを1リットルの坂口フラスコ中に入れ、J-1株を接種し、そして振とう機上で28℃で培養した。培養26時間と56時間後に、クロトンアミドを0.2%（w/v）

（800mg/400ml）添加して培養を続け、培養開始から76時間の時点で培養を終えた。

菌体を遠心分離機（日立SCR20B）で、10000gにて20分間遠心分離することによって採取し、0.85%NaClで洗浄し、再び

溶液から品出した。この結晶を回収し、メタノールから再結晶させた。

#### 実施例9

実施例8で得た菌体懸濁液（乾燥菌体5.92g相当）を10mMリン酸カリウム緩衝液（pH8.0）と1Mのベンゾニトリルを含む反応液（4ml）に加え、さらに反応開始1、2、3、4、5および7時間後に、それぞれ1Mのベンゾニトリルを添加し、25℃で反応を行なったところ、反応開始24時間後に7M（848g/リットル）のベンズアミドが100%の転換率で生成した。

#### 実施例10

実施例8で得た菌体懸濁液（乾燥菌体5.92g相当）を10mMリン酸カリウム緩衝液（pH8.0）と0.5Mの2,6-ジフルオロベンゾニトリルを含む反応液（4ml）に加え、さらに反応開始2、4、6および8時間後に、それぞれ0.5Mの2,6-ジフルオロベンゾニトリルを添加し、25℃で反応を行なったところ、反応

開始22時間後に2.5M (393g/リットル)の2,6-ジフルオロベンズアミドが100%の転換率で生成した。

#### 実施例11

実施例8で得た菌体懸濁液(乾燥菌体5.92g相当)を10mMリン酸カリウム緩衝液(pH8.0)と1Mの2-チオフェンカルボニトリルを含む反応液(4ml)に加え、さらに反応開始1時間後に、1Mの2-チオフェンカルボニトリルを添加し、25℃で反応を行なったところ、反応開始5時間後に2M (254g/リットル)の2-チオフェンカルボキサミドが100%の転換率で生成した。

#### 実施例12

実施例8で得た菌体懸濁液(乾燥菌体5.92g相当)を10mMリン酸カリウム緩衝液(pH8.0)と1Mの2-フロニトリルを含む反応液(4ml)に加え、さらに反応開始1、2、4、6、8、11および23時間後に、それぞれ1Mの2-フロニトリルを添加し、25℃で反応を行

なったところ、反応開始30時間後に8M (88g/リットル)の2-フランカルボキサミドが100%の転換率で生成した。

#### 実施例13

実施例8で得た菌体懸濁液(乾燥菌体5.92g相当)を10mMリン酸カリウム緩衝液(pH8.0)と4Mの3-インドールアセトニトリルを含む反応液(4ml)に加え、25℃で反応を行なったところ、反応開始24時間後に4M (697g/リットル)の3-インドールアセトアミドが100%の転換率で生成した。

#### 実施例14

実施例2で得た菌体懸濁液(乾燥菌体4.66g相当)を10mMリン酸カリウム緩衝液(pH8.0)と3Mのアクリロニトリルを含む反応液(4ml)に加え、さらに反応開始0、5、1および2時間後に、それぞれ2Mのアクリロニトリルを添加し、25℃で反応を行なったところ、反応開始8時間後に9M (640g/リットル)のアクリルアミドが100%の転換率で生成した。

第1頁の続き

⑤Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

// C 12 N 9/78  
(C 12 P 13/02  
(C 12 R 1:01)  
(C 12 P 17/00  
(C 12 R 1:01)  
(C 12 P 17/04  
(C 12 R 1:01)  
(C 12 P 17/10  
(C 12 R 1:01)  
(C 12 P 17/12  
C 12 R 1:01)

7823-4B